

ミセル動電クロマトグラフィーによる植物ホルモン 及びクロロフィル分析法に関する研究

著者	加藤 尚志
号	42
学位授与番号	1684
URL	http://hdl.handle.net/10097/38638

氏 名・(本 籍)	か とう ひさ し 加 藤 尚 志
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 1 6 8 4 号
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科, 専 攻	東北大学大学院理学研究科(博士課程)化学専攻
学 位 論 文 題 目	ミセル動電クロマトグラフィーによる植物ホルモン及びクロロフィル分析法に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 斎 藤 紘 一 教 授 寺 前 紀 夫, 小 林 長 夫

論 文 目 次

- 第1章 序論
- 第2章 溶質の二相分配系としての界面活性剤水溶液の評価
- 第3章 ミセル動電クロマトグラフィーにおけるオンライン濃縮法
- 第4章 オンライン濃縮を利用した植物ホルモン分析法の開発
- 第5章 クロロフィル分析法の確立
- 第6章 ワカメのクロロフィル分析への適用
- 第7章 総 括

論文内容要旨

第1章 序論

植物中に含まれる数々の低分子化合物は、他のアミノ酸や核酸、各種のタンパク質や構造多糖類などと比較すると、極めて微量しか存在していない。また、化学的に不安定な構造を持つ場合が多いため、他の夾雑物からの分離が困難であり、それぞれの化合物についての定量的な情報を得ることが困難であった。

本研究ではミセル動電クロマトグラフィー (Micellar Electrokinetic Chromatography; MEKC)に注目し、これを用いた植物中に含まれる低分子化合物の新規な分離分析法の開発と、その生体試料分析への適用を目的として研究を行った。具体的な分析対象として、植物の生理活動において最も重要な役割を持っていると考えられる二種の化合物群、植物ホルモン類とクロロフィル類を設定し、それぞれを分析する際に個別に問題となる点の解決とともに、MEKCにおける分離分析システムの設計における一般的な指針についても検討を行った。

第2章 溶質の二相分配系としての界面活性剤水溶液の評価

分析法開発の前段階として、ミセル動電クロマトグラフィーにおける分離媒体である界面活性剤水溶液を二相分配系であるとしたときに、どのような分離媒体であるかについて、直線溶媒和エネルギー関係を利用したLinear Solvation Energy Relationships(LSER)法による評価を行った。

MEKCによりミセル-水分配系についてLSER法による解析を行った結果、分配比に対して支配的な寄与を示しているのは疎水性相互作用であることを明らかとした。またバルク水相中のイオン強度を変化させて検討した結果、バルク水相の変化が引き起こす分配選択性の変化は、表面近傍に生じていると考えられる親水性相互作用、特に極性相互作用の寄与の変化が大きな影響を与えることなどを明らかにした。さらに、界面活性剤ミセルを構成するモノマー組成を変化させた場合についても解析を行った結果、コア部である疎水性領域が支配する疎水性相互作用の寄与はほとんど変化せず、表面近傍に生じていると考えられる親水性相互作用の寄与のみが大きな影響を受けていること、またこれにより分離選択性も大きく変化させることなどを明らかにした。実際に生合成界面活性剤であるアルスロファクチンとドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の混合ミセル系についてMEKCを行ったところ、LSER法による解析結果から予想された通り、フェノール類について特異的な保持の増大が見られることも確かめた。

この結果から、ミセル-水間の分配を制御するためには、ミセル表面やバルク水相の改質が重要であることが示唆されており、実際の分析系の設計における指針が示された。

第3章 ミセル動電クロマトグラフィーにおけるオンライン濃縮法

MEKCによる定量分析を行う際にしばしば問題となる定量感度の問題を解決する手段として、オンライン濃縮法、特にミセルの逆進を利用して電荷を持たない化合物についてもオンライン濃縮を達成させるStacking of Reverse Migrating Micelle - MEKC(SRMM-MEKC)法についての検討を行った。

従来法は低pH条件の泳動液を用いることでSRMM-MEKCを達成していたが、この条件では生体由来の化合物が分解する可能性があった。そこで、コーティング剤として親水性の比較的高いポリアクリルアミドを用いてコーティングキャピラリーを作成し、これにより従来は成立しないとされていた中性pH領域におけるSRMM-MEKC法によるオンライン濃縮を達成することに成功した。このコーティングキャピラリーは、市販品に比べ耐久性が高く、最長で120時間電気浸透流を抑制することが可能であった。

pH7 条件下におけるSRMM-MEKCでは検出感度も約4000倍のピーク高さの増大が得られ、その溶出順序は通常のMEKCの場合とは逆転していることを確かめた。またミセルに対する保持の大きな化合物ほど濃縮効率が高いことを明らかとし、低塩濃度の試料溶液中において、ミセルが崩壊しながら試料の濃縮を行っている可能性を示した。

pH 7付近でのMEKCにおけるオンライン濃縮が可能となったため、本研究で目的としているような生体由来の化合物についても、pHの影響による分析中の試料の分解が抑えられることが期待され、適用の幅をより広げることが可能とすることが出来た。

第4章 オンライン濃縮を利用した植物ホルモン分析法の開発

SRMM-MEKC法によるオンライン濃縮法を植物ホルモンの分析に利用した。

その結果、本研究で用いた試料については、低pH条件下における試料の変成は見られなかったものの、共存するポリアミンや核酸などの夾雑物から植物ホルモン類を完全に分離するためには、第3章で開発した中性pH領域におけるSRMM-MEKC法を適用する必要があることを明らかとした。

また、常温で保存、あるいは前処理などを行うことにより、試料の変成が生じることを確かめ、より前処理の少ない分析法の開発が必須であることを証明した。

pH 7条件下でのSRMM-MEKCにより、ピーク高さで最大約2000倍（ゼアチン）の感度の増大が見られた。また、SDS 100 mM 印加電圧 -20 kVの条件で、サイトカイニン類、オーキシン類、ジベレリン類、アブシジン酸の4グループ、12種類の植物ホルモン類の化合物を一斉に分離すると同時に、共存するポリアミンや核酸、タンパク質などと言った夾雑物との相互分離が達成されることを確認した。

これらの結果は、本法を用いることで、検出器の感度などの装置的な問題点は残るものの、原理的には試料からの抽出液に対して特別な前処理を必要としない、新しい植物ホルモニー斉分析法が実現出来ることを実証した。

第5章 クロロフィル分析法の確立

植物ホルモン同様植物生理学的に極めて重要な低分子化合物の一つであるクロロフィル類の分析法について検討を行った。

試料の精製法についても検討を行った。その結果、従来法に比べ、簡便で効率の良いChl- c_1 と Chl- c_2 精製法を構築し、ワカメ100 g（湿重量）中から1 mgのChl- c_1 と Chl- c_2 を得ることを可能とし、一部操作の自動化についても成功した。

また、もっとも分離困難であると考えられてきたChl- c_1 と Chl- c_2 のMEKCによる相互分離について検討した。通常のMEKC条件でこれらの分離は達成されなかったが、泳動液中に有機溶媒を添加することで、ミセルからバルク水相への分配が増加させられて、Chl- c_1 と Chl- c_2 の分離度が向上されることを確かめた。その結果、DMFをSDSを含むpH 11の緩衝溶液に対して体積比で10:3以上添加した溶液条件の下で、Chl- c_1 と Chl- c_2 の完全な分離が達成できることを見いだした。

Chl-aとChl-bの様な疎水性の比較的高いMg錯体ではキャピラリー壁面への吸着が起き、分離度が悪化するという現象が見られたが、Mgへの配位性を有するドナー性の溶媒を添加することでキャピラリー壁面との相互作用が相殺され、良好な分離が得られることが分かった。本研究で使用した溶媒の中ではピリジンがもっとも良い結果を示し、SDS 50 mM を含むpH 11の緩衝溶液に対して体積比で10:3のピリジンを添加した場合を分離条件として設定した。

また、本法の定量性についても、内標準法による分析において、 10^{-4} M～ 10^{-6} Mの範囲で相対標準偏差で1～2%の再現性が得られ、従来簡便法として用いられている吸光光度法はもちろん、現在最も正確な値

を得ることができるとされているHPLCと比較しても、同等以上の高い精度で定量値が得られることを示した。

第6章 ワカメのクロロフィル分析への適用

MEKCを実際の生体試料中のChl分析に適用し、その応用性を実証した。Chl- c_1 と Chl- c_2 を含む大型海藻である褐藻類の一種のワカメを用いて実際の海藻試料の分析への適用について検討を行った。

採取時期や一個体中の部位によるChl存在量の違いを調べた結果、ワカメの生長の活性度や光合成活性度とChl-aの存在量の間に正の相関が見られた。部位により光合成の活性度である単為面積辺りの酸素発生量が異なることが知られていたため、Chl-aの存在量も部位により異なっているであろうことは以前から指摘されていたが、従来の大型藻類のChl分析に関する報告では一個体全ての平均という形でしか定量されていないため、実際に部位によりChl量が異なっていることを確かめたのは今回の研究が初めてである。

また、Chl- c_1 と Chl- c_2 の量比が採取時期や個体中の部位および生育環境によって異なっていることも初めて明らかとした。ワカメが節間生長を行っており、葉状部の先端部と仮根の部分では細胞の発生した時期が異なること、同一の部位においても採取した時期が遅くなるにつれてChl- c_1 と Chl- c_2 の量比が一樣に変化していること、また光のほとんど届かない劣悪な生育環境下で生育したワカメでは、この値がより遅い時期に採取したワカメと類似した値を持っていることなどから、Chl- c_1 と Chl- c_2 の量比がワカメの老化や生長の度合いの指標として用いることができる可能性も示唆された。

第7章 総括

総括として本研究の成果をまとめた。

論文審査の結果の要旨

本論文は全7章から構成されている。

第1章では、研究の背景、目的および意義が提示されている。植物中に含まれる低分子化合物の多くは、極めて微量であり、これまで各化合物についての定量的情報を得ることが困難であった。本研究は、ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC)を用いた新規な分離分析法を開発し、生体試料に適用することを目的としている。

第2章では、溶質の二相間分配の場である界面活性剤ミセル溶液の特性をLSER法により評価している。バルク水相の変化は、ミセル表面近傍での極性相互作用に影響を及ぼし、さらに分配の選択性の変化を引き起こすことを明らかにした。この結果から、ミセル-水間の分配の制御には、ミセル表面やバルク水相の改質が重要であると結論している。

第3章では、MEKCの検出感度を向上させるため、オンライン濃縮法の導入を試み、キャピラリーをポリアクリルアミドでコーティングすることにより、これまで不可能とされてきた中性pH領域でのオンライン濃縮が実現できることを示した。第4章では、このオンライン濃縮を利用し、4種の植物ホルモン計12化合物の一斉分離分析が可能であることを実証した。

第5章では、クロロフィル (Chl) 分析へのMEKCの適用を検討した。界面活性剤ミセル水溶液を泳動液に用いる通常のMEKCではChl類の分離は不可能であるが、ピリジンのようなドナー性溶媒を泳動液に添加することによってChl類の一斉分析が可能になることを見出した。つづく第6章では、このMEKC法をワカメ中のクロロフィル分析に適用して、Chl-a, Chl-c₁, Chl-c₂の存在比が採取時期や個体中の部位、生育環境によって異なることを初めて明らかにするなど、その有用性を実証した。

これらの研究成果は、自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって加藤尚志提出の論文は、博士（理学）の学位論文として合格と認める。